

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 01042427 A

(43) Date of publication of application: 14 . 02 . 89

(51) Int. Cl

A61K 31/35
A61K 31/70
C07D311/60
C07H 17/07

(21) Application number: 62198194

(22) Date of filing: 10 . 08 . 87

(71) Applicant: TSUMURA & CO KITASATO
INST:THE

(72) Inventor: YAMADA AKISHIRO
CHIYOU SOUTETSU
OTSUKA TAKAO
NAGAI TAKAYUKI
SAKAKIBARA IWAO
MIHASHI HIROSHI

(54) SIALIDASE INHIBITOR

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a sialidase inhibitor, containing formononetin, luteolin or luteolin-7-O-glucoside as active ingredients, applicable to medicines, such as anti-inflammatory agent and having high safety with low toxicity.

CONSTITUTION: A sialidase inhibitor obtained by extracting Dalbergia odorifera T. CHEN which is heart wood of dried root of a leguminous plant or Chrysanthemum indicum L. which is a dried flower part of a composite plant as a raw material with a solvent, such as methanol, by heating at 0°CW the boiling point

temperature of the solvent or using ultrasonic waves to provide an extract solution, directly or concentrating or drying the extract solution and subjected the resultant substance to column chromatography with an adsorbent, such as silica gel, to afford a fraction, recrystallizing the obtained fraction from a solvent, such as water or methanol, to afford the aimed compound which is an active ingredient. The resultant substance can be prepared in the form of a pharmaceutical by a conventional method and the dose thereof as an oral agent is 100W450mg in several divided portion a day for an adult.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭64-42427

⑫ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)2月14日

A 61 K 31/35

A E D

7375-4C

31/70

A B E

7431-4C

C 07 D 311/60

7375-4C

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 シアリダーゼ阻害剤

⑮ 特 願 昭62-198194

⑯ 出 願 昭62(1987)8月10日

特許法第30条第1項適用 昭和62年7月25日発行の「第4回和漢医薬学会学術総会」に発表

⑰ 発 明 者 山 田 陽 城 東京都練馬区上石神井南町4-26

⑱ 発 明 者 丁 宗 鉄 東京都昭島市拝島1-1-10

㉑ 発 明 者 大 塚 恭 男 東京都新宿区三栄町13

㉒ 発 明 者 永 井 隆 之 東京都港区白金6丁目10番16号

㉓ 発 明 者 柳 原 盛 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社津村順天堂津村研究所内

㉔ 出 願 人 株式会社津村順天堂 東京都中央区日本橋3丁目4番10号

㉕ 出 願 人 北里研究所(社団法人) 東京都港区白金5丁目9番1号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

シアリダーゼ阻害剤

2. 特許請求の範囲

フォオルモネチン、ルテオリンまたはルテオリン-7-O-グルコシドを有効成分とするシアリダーゼ阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、シアリダーゼ阻害作用を有し、炎症抑制等の医薬品として応用が期待されるシアリダーゼ阻害剤に関するものである。

〔従来の技術および問題点〕

複合糖質の糖鎖非還元末端に存在するシアル酸はその除去により血清糖蛋白質の代謝回転や細胞間認識を妨めとする生体内の種々の生物反応において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

この他、免疫原性に関与し、シアル酸が細胞表面糖鎖抗原の抗原決定基に結合することにより、

その抗原性を隠蔽していることも知られている。

さらに、炎症性疾患や癌、膠原病、並びにその近縁疾患(リウマチを含む)での血清シアル酸含量の増加や肝疾患、特に脂肪肝や肝硬変における血清シアル酸値の低下、喘息患者におけるヒトリンパ球シアル酸値の低下が知られている。

一方、東洋医学における病態認識の一つである瘀血病態の患者では全血および血漿粘度の上昇に伴い、血清シアル酸含量が増加することが最近知られている。

このようにシアル酸は生体内機構において重要な役割を果たし、種々の病態に関与していることが考えられる。

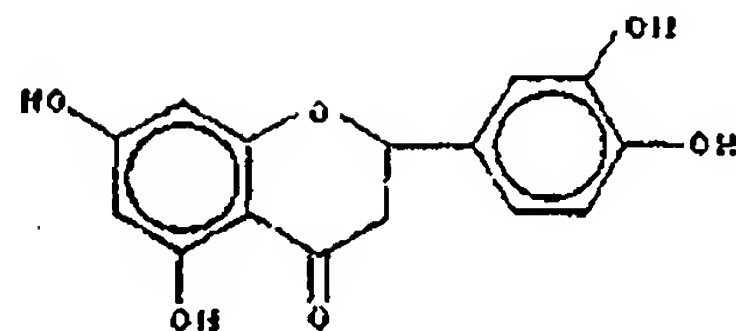
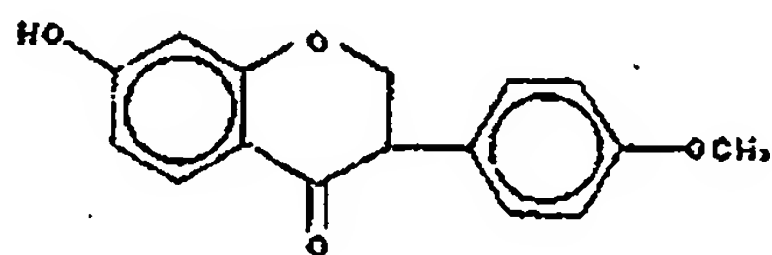
シアリダーゼは、このシアル酸残基を糖鎖から遊離させる加水分解酵素であり、本酵素活性に影響を与える物質は、上記の種々のシアル酸の関係する病態を調節し得る可能性がある。

〔問題点を解決するための手段〕

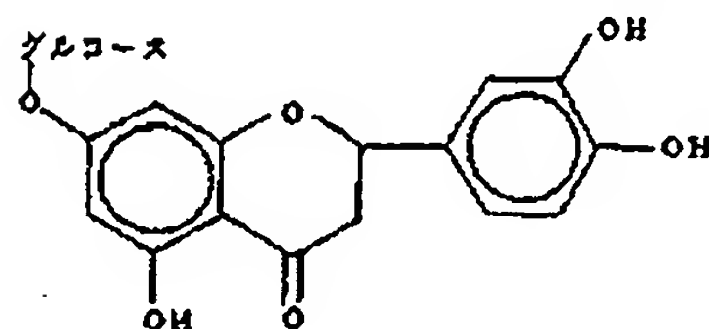
本発明者等は、シアリダーゼ阻害作用を有する物質を見いだすべく探索研究を重ねた結果、フォ

ルセネチン、ルテオリンまたはルテオリン-7-O-グルコシドがシアリダーゼ阻害作用を有することを見だし、これに基づいて本発明を完成するに至った。すなわち本発明はフオルモネチン、ルセネチンまたはルテオリン-7-O-グルコシドを有効成分とするシアリダーゼ阻害剤である。フオルモネチン、ルテオリンまたはルテオリン-7-O-グルコシド(以下、本発明の有効成分化合物と称する。)はそれぞれ以下に示す構造を有する物質である。

【フオルモネチン(Fornononetin)】



【ルテオリン-7-O-グルコシド】



本発明の有効成分化合物は、例えばマメ科の植物(*Dalbergia odorifera* T. CHEN)の乾燥根部の心材である降香またはキク科の植物(*Chrysanthemum indicum* L.)の乾燥花部である野菊花を原料として、次のようにして得ることができる。

降香または野菊花を水、メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ベンゼン、クロロホルム、エーテル、*n*-ヘキサン、石油エーテルから選ばれる単独またはそれ以上の混合溶媒を用いて0℃から使用する溶媒の沸点以下の温度に加熱して抽出するか、または0℃から室温で超音波抽出して抽出液を得る。この抽出液をそのまま、または濃縮あるいは乾燥して、シリカゲル、ODS-シリカゲル等の吸着剤を使用したカラムクロマトグラフィーに付し、抽出液を分取し画分を得る。この際、溶出溶媒として、水またはメタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、アセトニトリル、クロロホルム、ベンゼン、エーテル、*n*-ヘキサン、石油エーテル等の単独もしくはそれ以上の混合溶媒を使用し得る。

また必要に応じ、カラムクロマトグラフィーに付す前に、エーテル、*n*-ブタノール、クロロホルム等の水不溶性溶媒を用いて1回または数回分配抽出を行ってもよい。

このようにして得た画分を水、メタノール、エ

タノール、アセトン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、クロロホルム、エーテル、*n*-ヘキサン、石油エーテル等の単独またはそれ以上の混合溶媒で再結晶して本発明の有効成分化合物を得ることができる。

次に本発明の有効成分化合物の製造の具体例を示す。

具体例1

降香(*Dalbergia odorifera* T. CHEN)の乾燥根部心材)500gを粉砕し、メタノール5ℓを加えて2時間加熱還流抽出し、抽出液の溶媒を減圧下に留去し、乾燥エキスを70.5g(収率14.1%)を得た。このメタノール抽出エキスを水1ℓを加えてエーテル1ℓで8回分配抽出した。得られたエーテル画分を減圧下で溶媒を留去し、エーテルエキスを33.5gを得た。このエーテルエキスをシリカゲル(Kieselgel 60, 70-230メッシュ、メルク社製)500gを使用したカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒で酢酸エチルの混合比率を順次増加させて溶

出した。n-ヘキサン・酢酸エチル(2:1)の混合溶媒で溶出したフラクションをその溶出溶媒で再結晶し、微黄色針状物質を得た。

この微黄色針状物質の理化学的性質は文献[S. Saitoh, B. Hoguechi, S. Shibata, Chen, Pharm. Bull., 26, 144(1978)]記載のフォルモネチンの理化学的性質に一致した。

具体例2

野菊花(*Libysanthemon indicum* L.の乾燥花部) 800gを粉砕し、メタノール8ℓを加えて2時間加熱過濾抽出し、抽出液を冷却した後、濾過した。抽出液の溶媒を減圧下に留去し、乾燥エキスを202.4g(収率25.3%)を得た。このメタノール抽出エキスを水1.5ℓを加えて、エーテル1.5ℓで3回分配抽出した。エーテル層を除いた残りの水可溶物をn-ブタノール1.5ℓで3回分配抽出した。

このようにして得たn-ブタノール層を減圧下で溶媒を留去し、n-ブタノールエキスを52.9g

Muhammad, Heterocycles, 14, 1973(1989)]記載のルテオリン・7-O-グルコシドの理化学的性質に一致した。

次に本発明がシアリダーゼ阻害作用を有することを実験例を挙げて説明する。

実験例1

宮城らの方法に従い、濾過したCCR系マウス(6〜7週齢)の肝臓をホモジネートした後、1.000×9上清液分をマウス肝シアリダーゼ阻害薬として用いた。

シアリルラクトースを基質とし、具体例1〜3で得た化合物の存在下酵素反応を行い、その反応液からイオン交換樹脂により妨害物質を除き、テオバルビツール酸反応により遊離シアラ酸を定量化し、シアリダーゼ活性を測定した。

その結果を第1表に示す。

を得た。このn-ブタノールエキスをシリカゲル(Kieselgel 60, 70-230メッシュ、メルク社製)500gを使用したカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムとメタノールの混合溶媒でメタノールの混合比率を順次増加させて溶出した。クロロホルム・メタノール(9:1)の混合溶媒で溶出したフラクションをメタノールで再結晶し、黄色針状物質を得た。

この黄色針状物質の理化学的性質は文献[Yoshikazu Kondo, Kyoko Sugiyama, Shigeo Kozoe, Chen, Pharm. Bull., 34(11), 1819(1986)]記載のルテオリンの理化学的性質に一致した。

具体例3

具体例2のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいてクロロホルム・メタノール(3:1)の混合溶媒で溶出したフラクションをメタノールで再結晶し、微黄色針状物質を得た。

この微黄色針状物質の理化学的性質は文献[Muhammad Afzal, Galib Ali-Orqueel, Nazir

第1表

試験薬剤(終濃度125μg/μl)	阻害率(%)
具体例1で得た化合物	26.5
具体例2で得た化合物	23.8
具体例3で得た化合物	30.4

第1表に示すように具体例1〜3で得た化合物は、終濃度125μg/μlにおいてマウス肝シアリダーゼ阻害活性が認められた。

次に具体例1〜3で得た化合物の急性毒性試験をddY系雄マウスを用いて行ったところ、いずれも1g/μlの経口および腹腔内投与で死亡例はなかった。

このように本発明の有効成分化合物は極めて毒性が低く、安全性の高いものである。

次に、本発明の有効成分化合物の投与量および製剤化について説明する。

本発明の有効成分化合物はそのまま、あるいは慣用の製剤剤体と共に動物および人に投与することができる。投与形態としては、特に限定がなく、

必要に応じて適宜選択して使用され、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

経口剤として所期の効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で本発明の有効成分化合物の重量として100～450mgを、1日数回に分けての服用が適当と思われる。

本発明において錠剤、カプセル剤、顆粒剤等の経口剤は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニツト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、糊化澱粉等を用いて常法に従って製造される。

この種の剤剤には、適宜前記賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性増進剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができ、それぞれの具体例は以下に示す如くである。

〔結合剤〕

デンプン、デキストリン、アラビアゴム末、ゼラチン、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセ

ルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、

〔崩壊剤〕

デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース。

〔界面活性剤〕

ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、シロ糖脂肪酸エステル、ポリソルベート80。

〔滑沢剤〕

タルク、ロウ類、水素添加植物油、シロ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ポリエチレングリコール。

〔流動性増進剤〕

軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、

合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム。

また、本発明の有効成分化合物は、懸濁液、エマルジョン剤、シロツブ剤、エリキシル剤としても投与することができ、これらの各剤剤形には、矯味矯臭剤、着色剤を含有してもよい。

非経口剤として所期の効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で本発明の有効成分化合物の重量として1日2～30回までの静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射が適当と思われる。

この非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラツカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤を加えてもよい。また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥技術により水分を除去し、使用前に凍結乾燥物から液剤を再調製することもできる。更

に、必要に応じて適宜、等張化剤、安定剤、防腐剤、無菌化剤等を加えても良い。

その他の非経口剤としては、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、常法に従って製造される。

以下に実施例を示して本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれにより何等制限されるものではない。

実施例1

① コーンスターチ	39g
② 結晶セルロース	30g
③ カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④ 軽質無水ケイ酸	0.6g
⑤ ステアリン酸マグネシウム	0.5g
⑥ 具体例1で得た化合物	25g
計	100g

上記の処方に従って①～⑥を均一に混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例で得た化合物50mgが含まれており、成人1日2～9錠を数回にわけて服用する。

実施例2

①結晶セルロース	89g
②ステアリン酸マグネシウム	1g
③カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④具体例2で得た化合物	2.5g
計	100g

上記の処方に従って①、④および②の一部を均一に混合し、圧縮成型した後、粉碎し、③および④の残量を加えて混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例で得た化合物50mgが含まれており、成人1日2～9錠を数回にわけて服用する。

実施例3

①結晶セルロース	44.5g
②10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液	25g
③カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④ステアリン酸マグネシウム	0.5g
⑤具体例3で得た化合物	2.5g
計	100g

上記の処方に従って①、②および③を均一に混合し、常法によりねっ相し、押し出し造粒機により造粒し、乾燥・篩分した後、④および⑤を混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例で得た化合物50mgが含まれており、成人1日2～9錠を数回にわけて服用する。

実施例4

①注射用蒸留水	適量
②ブドウ糖	200mg
③具体例1で得た化合物	5mg
全量	5ml

注射用蒸留水に②および③を溶解させた後、5mlのアンプルに注入し、121℃で15分間加熱滅菌を行って注射剤を得た。

特許出願人 株式会社 津村順天堂
代表者 津 村 昭



特許出願人 北里研究所（社団法人）
代表者 水 之 江 公 英

第1頁の続き

④Int. Cl.⁴

C 07 H 17/07

識別記号

庁内整理番号

7417-4C

の発 明 者 三 橋

博

茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社津村順天堂津村研
究所内